Aus dem Robert Koch - Institut Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Henneberg

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE THERMOSTABILITÄT KOMPLETTER VIREN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an der ehemaligen
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Otte
aus Berlin

1970

Aus dem Robert Koch - Institut Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Henneberg

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE THERMOSTABILITÄT KOMPLETTER VIREN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an der ehemaligen
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Otte
aus Berlin

ehem. Dekan: Prof. Dr. med. Herbert Lax

Referent: Prof. Dr. med. Georg H e n n e b e r g

Korreferent: Prof. Dr. med. Klaus Großgebauer

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promoviert am: 24.10.1970

Gedruckt mit Genehmigung der ehem. Medizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE THERMOSTABILITÄT KOMPLETTER VIREN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546516_0004

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	ALLGEMEINES ÜBER DIE THERMOINAKTIVIERUNG VON VIREN	2
II	DIE DEN EXPERIMENTEN ZUGRUNDE LIEGENDE FRAGESTELLUNG	5
III	DURCHFÜHRUNG DER EXPERIMENTE - MATERIAL UND METHODEN	6
	1. Angaben zu den Versuchen mit Influenza Virus A_2 Berlin 12/60	7
	2. Angaben zu den Versuchen mit Herpes simplex - Virus Typ humanus	9
	3. Angaben zu den Versuchen mit Vaccinia - Virus Stamm Herzberg	9
	4. Angaben zu den Versuchen mit Adeno - Virus 5	10
IV	ERGEBNISSE	12
	1. Versuchsprotokoll	12
	2. Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse	15
	3. Tabellarische Übersicht der Ergebnisse	16
V	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	17
VI	LITERATURVERZEICHNIS	27

I. ALLGEMEINES ÜBER DIE THERMOINAKTIVIERUNG VON VIREN

Zwei Eigenschaften der pathogenen Viren sind von überragender Bedeutung: die Infektiosität, d.h. die Fähigkeit, in die Zelle des Makroorganismus einzudringen und sich dort zu vermehren, und die Antigenität, d.h. die Fähigkeit, im Fremdorganismus Antikörperbildung zu veranlassen oder mit schon vorhandenen Antikörpern zu reagieren. Diese beiden Eigenschaften sind verantwortlich für die Pathogenität der Viren. Werden sie durch die Einwirkung entsprechend starker chemischer oder physikalischer Noxen zerstört, so geht dem Virus damit die Aggressivität gegenüber dem Wirtstier oder der Wirtspflanze verloren.

Werden Viren auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Wärme untersucht, gilt als Kriterium der Beeinflussung meist das Verhalten der Infektiosität, die eine gut meßbare Lebensäußerung des Virus darstellt. In fast allen veröffentlichten Arbeiten über die Thermoinaktivierung von Viren wird daher die Abschwächung oder völlige Zerstörung der Infektiosität als Zeichen für eine stattgehabte Schädigung oder Vernichtung des Virions herangezogen. Als Beispiele dafür seien genannt die Arbeiten von: Dougherty (1), Rapp, Butel und Wallis (2), Bachrach et al. (3), Mika et al. (4), Kaplan (5), Brown et al. (6), Krugman und Goodheart (7), Boak, Carpenter und Warren (8) und Giacometti (9).
Morphologische Veränderungen als Parameter für die Virusschädigung durch Hitze haben dagegen Simpson und Hauser (10) herangezogen. Mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen gelang es ihnen, Strukturänderungen des Virus unter der Erwärmung nachzuweisen.

Das Verhalten der Viren bei höheren Temperaturen ist für mehrere Forschungsgebiete der Medizin und Biologie von großem Interesse. Vor allem der Hygieniker muß sich mit der Frage beschäftigen, welche Temperaturen von den verschiedenen menschen - und tierpathogenen Viren ertragen werden, um zuverlässige Desinfektions- und Sterilisationsmaßnahmen herauszufinden. Die umfassende Bedeutung der Hitzesterilisation hat sicherlich dazu beigetragen, daß

so zahlreiche experimentelle Untersuchungen zur Abklärung der Überlebensfähigkeit von Viren bei Wärme durchgeführt wurden. Aus epidemiologischer Sicht ist die Hitzewirkung auf die Infektiosität der Viren ebenfalls bedeutsam. In der Impfstoffherstellung wird andererseits der Veränderung der antigenen Eigenschaften des Virions mehr Aufmerksamkeit geschenkt.

Es erhebt sich die Frage, ob unter den bekannten Virusarten einige auffällig thermoresistent sind und durch diese Qualität vielleicht in ihrer Verbreitung wesentlich begünstigt werden.

Größere Hitzestabilität im Vergleich zu anderen Viren wird im allgemeinen dem Hepatitis - Virus nachgesagt. Grundlage für diese Beurteilung sind anscheinend im wesentlichen empirisch aus epidemiologischen Beobachtungen gefundene Daten. Experimentelle Beweise, daß dem Hepatitis - Virus eine besondere Thermostabilität eigen sei, sind kaum erbracht worden, da der Erreger der Hepatitis bis heute weder identifiziert noch reingezüchtet werden konnte. Daraus ergeben sich beinahe unüberwindliche methodische Schwierigkeiten, dieses Virus in Thermoinaktivierungsstudien zu testen. W.P. Havens (11) hat sich 1945 über dieses Hindernis hinweggesetzt und ein Experiment durchgeführt, das eine präzise Aussage über das Verhalten des Hepatitis - Virus bei einer Temperatur von 56 Grad C gestattete. Der Autor inokulierte acht Strafanstaltsinsassen, die sich freiwillig als Versuchspersonen zur Verfügung gestellt hatten, mit Serum, das von nachweislich an infektiöser Gelbsucht erkrankten Menschen gewonnen und eine halbe Stunde lang auf 56 Grad C erhitzt worden war. Vier der Probanden erhielten das Material subcutan bzw. intracutan appliziert, die vier anderen nahmen es per os zu sich. Die Hälfte der Versuchspersonen erkrankte daraufhin an infektiöser Hepatitis, und zwar drei der enteral und eine der parenteral infizierten Personen. Das infektiöse Agens, - der Autor sprach damals noch nicht vom Hepatitis-Virus, muß also die Erwärmung auf 56 Grad C überstanden haben, ohne seine pathogene Wirkung völlig einzubüßen. Dieses Experiment allein erlaubt noch nicht, das Hepatitis - Virus als sehr hitzebeständig zu bezeichnen. Auch andere Viren können eine Temperatur

von 56 Grad C längere Zeit ertragen. Da jedoch 50 % der Probanden an Hepatitis erkrankten, liegt der Schluß nahe, daß das im Serum enthaltene Virus nur zu einem geringen Teil inaktiviert worden war. Eine Aussage über die absolute Überlebensfähigkeit des Hepatitis - Virus konnte anhand dieses Experiments nicht gemacht werden.

II. DIE DEN EXPERIMENTEN ZUGRUNDE LIEGENDE FRAGESTELLUNG

Neuere Untersuchungen auf dem Gebiete der Hepatitis - Forschung haben Hinweise darauf ergeben, daß der gesuchte Erreger zu der Gruppe der Adeno - Viren gehören könnte. Wäre das tatsächlich der Fall, so interessierte die Frage, ob ein Adeno - Virus die für das Hepatitis - Virus postulierte Thermostabilität besitzt. Würde sich für das Adeno - Virus nur mäßige Hitzebeständigkeit nachweisen lassen, so wäre damit natürlich kein gültiges Indiz erbracht, das die Identität von Hepatitis - und Adeno - Virus ausschließt. Zum einen erscheint die Indifferenz des Erregers der Hepatitis gegenüber Wärme nicht ausreichend bewiesen, zum anderen ist es ungewiß, welche Hilfsfaktoren die Thermostabilität des Virus in vivo eventuell verbessern. Da hier außerdem nur ein serologischer Adeno - Virus - Typ als Repräsentant für sämtliche Typen untersucht wird, muß daran gedacht werden, daß verschiedene Typen stark differierende Thermostabilität besitzen können. Über das Verhalten des Adeno - Virus hinaus interessiert die Frage, wie sich verschiedene Virusarten in ihrer Thermostabilität unterscheiden, wenn sie unter möglichst konstanten experimentellen Bedingungen bei höheren Temperaturen in flüssigem Milieu inaktiviert werden.

III. DURCHFÜHRUNG DER EXPERIMENTE - MATERIAL UND METHODEN

Untersucht wurde die Wärmeempfindlichkeit von Adeno - Virus 5, Influenza - Virus A_2 Berlin 12/60, Herpes simplex - Virus Typ humanus und Vaccinia - Virus Stamm Herzberg. Aus der Adeno - Virusgruppe wurde der Typ 5 gewählt, weil er auf Gewebekulturen einen gut ablesbaren cytopathologischen Effekt ausbildet. Dadurch wird der Virusnachweis erleichtert, wenn nach der erfolgten Thermobehandlung das untersuchte Material auf noch vorhandene Infektiosität hin geprüft wird. Aus demselben Grunde eigneten sich auch die anderen genannten Viren für die Inaktivierungsexperimente, - sie lassen sich leicht auf embryonierten Hühnereiern züchten. Der einzige Vertreter der Gruppe der RNS - Viren war das Influenza - Virus, die übrigen Arten repräsentierten die DNS - Viren. Allen vier Arten gemeinsam ist die Menschenpathogenität.
Für die Inaktivierung dieser Viren wurden Versuchstemperaturen von 50, 55 und 60 Grad Celsius gewählt. Bei der Durchsicht von Arbeiten anderer Autoren war aufgefallen, daß in diesem Temperaturbereich nur noch relativ kurze Überlebenszeiten der Viren beobachtet wurden. Insbesondere bei 60 Grad C war eine rasche Inaktivierung zu erwarten. Versuche bei niedrigeren oder noch höheren Temperaturen ließen keine größere Aussagekraft der Ergebnisse erwarten.

Die Erwärmung der Virusproben erfolgte in einem durch Thermostatenregulierung auf konstanter Temperatur gehaltenen Wasserbad. Eine automatische Rührvorrichtung sorgte für eine gleichmäßige Erwärmung des Wassers.

Ziel der Untersuchungen war es herauszufinden, wielange das betreffende Virus bei einer bestimmten Temperatur überleben kann. Nach orientierenden Vorversuchen, die einen Überblick ergaben, wann etwa die Thermoinaktivierung des Virus vollendet sein würde, erfolgte die Aufstellung eines Zeitplanes, in dem die Entnahme von Virusproben aus dem Wasserbad zu fünf verschiedenen Zeiten für den Hauptversuch festgelegt war. Nach der Auswertung des Infektiositätsnachweises in allen entnommenen Virusproben

stand fest, welche Zeit für die völlige Inaktivierung des Virus benötigt worden war.

Dieses Vorgehen wich ab von der Methodik, die andere Autoren für ihre Inaktivierungsexperimente gewählt hatten. In vielen Arbeiten wurde die Kinetik der Thermoinaktivierung von Viren untersucht. Dafür waren laufende Bestimmungen des Titerverlustes im Untersuchungsmaterial erforderlich. Nach der Ermittlung der Inaktivierungskurven der jeweiligen Viren bei verschiedenen Temperaturen konnten die Autoren anhand der Arrheniusschen Gleichung die erforderlichen Aktivierungsenergien berechnen und Vermutungen darüber anstellen, welche Virusstrukturen bei welchen Temperaturen durch die Hitzewirkung zerstört wurden. Woese (12) hat eine detaillierte Abhandlung über diese theoretischen Grundlagen der Thermoinaktivierung von Viren veröffentlicht. Es gelang ihm, viele bis dahin schlecht zu interpretierenden Einzelbeobachtungen in einer Arbeitshypothese zusammenzufassen.

Da bei der Untersuchung der oben genannten vier Virusarten leichte Abweichungen in der Versuchsdurchführung unumgänglich waren, werden nachfolgend für jedes Virus die experimentellen Besonderheiten aufgezeichnet:

1. Angaben zu den Versuchen mit Influenza - Virus A_2 Berlin 12/60

Die Ausgangssuspension des in Hühnerallantoisflüssigkeit enthaltenen hühnereiadaptierten Virus wurde titriert.
Die nach der Methode von Reed und Muench (15) berechnete ID_{50} betrug $10^{-6,5}$. Für die Dauer der Experimente wurde die auf Einzelportionen verteilte Virussuspension in Ampullen bei - 20 Grad C aufbewahrt.
Vor jedem Versuch wurde eine Portion aufgetaut und mit gepufferter Kochsalzlösung auf 10^{-3} verdünnt. Mengen von jeweils 1 ml wurden in dünnwandigen 5 ml - Ampullen aus Jenaer Glas eingeschmolzen. Die mit Bleigewichten beschwerten Ampullen wurden bei gleichzeitiger Betätigung der Stoppuhr in dem auf die ge-

wünschte Temperatur erwärmten Ultrathermostaten - Wasserbad versenkt, so daß sie vom Wasser völlig bedeckt waren. Nach den vorher festgelegten Zeiten wurden jeweils drei Ampullen gleichzeitig dem Wasserbad entnommen und sofort in Eiswasser gekühlt, um ein Fortschreiten der Hitzeinaktivierung zu verhindern. Nach der Entnahme aller Ampullen erfolgte die Überimpfung des Untersuchungsmaterials auf zehn Tage lang bei 38 Grad C vorbebrütete Hühnereier von weißen Leghornhennen. Mit 2 ml - Rekordspritzen und 16 er Kanülen wurden mit dem Inhalt jeder Ampulle die Allantoishöhlen von drei Hühnereiern mit 0,2 ml inokuliert (Technik der Beimpfung siehe (13)). Nach zweitägiger Bebrütung bei 38 Grad C wurde unter sterilen Kautelen die Allantoisflüssigkeit der Eier geerntet und im Hämagglutinationsversuch mit Hammelerythrocyten der indirekte Virusnachweis geführt. Nur, wenn noch infektiöses, vermehrungsfähiges, hämagglutininbildendes Virus auf die Eier gebracht worden war, konnte man in der Allantoisflüssigkeit Hämagglutinine in so hoher Konzentration erwarten, daß sie einen positiven Ausfall des Testes bewirkten. Bei der Inokulation der Eier überimpfte Agglutinine hätten sich wegen des starken Verdünnungseffektes dem Nachweis entzogen.

Parallel zu dem hitzebehandelten Virus wurden Leerproben mit gepufferter Kochsalzlösung und Proben mit unbehandeltem Virus als Kontrollen untersucht.
Beim Hämagglutinationstest wurde Allantoisflüssigkeit nicht beimpfter Eier als negative Kontrolle mituntersucht.

Nach Abschluß aller Versuche konnte mit einer Kontrolltitration der Ausgangssuspension nachgewiesen werden, daß während der Lagerung des Virus in der Tiefkühltruhe kein Titerverlust eingetreten war. Damit war bestätigt, daß in den einzelnen Versuchen gleichtitriges Material getestet worden war.
Die Virussuspension war auf Bakterienfreiheit untersucht worden.

2. Angaben zu den Versuchen mit Herpes simplex - Virus Typ humanus:

Die Ausgangssuspension wurde durch sterile Homogenisierung von reichlich virushaltigen Chorioallantoismembranen und Verdünnung des Homogenisats mit gepufferter Kochsalzlösung gewonnen. Die ID_{50} nach Reed und Muench (15) betrug $10^{-5,2}$. Aufbewahrung des Virus in Einzelportionen in der Tiefkühltruhe. Vor jedem Versuch Weiterverdünnung der Ausgangssuspension auf 10^{-3} mit gepufferter NaCl - Lösung. Ablauf der Hitzeinaktivierung im Wasserbad wie beim Influenza - Virus. Überimpfung des hitzebehandelten Virus mit 1 ml - Pipetten auf die gesenkte Chorioallantoismembran von Hühnereiern gleicher Herkunft wie oben. Jedes Inokulum à 0,2 ml. Pro Ampulle Virusnachweis auf drei Eiern. Nach zwei - bis dreitägiger Bebrütung bei 38 Grad C wurden die Allantoismembranen geerntet und unter dem Plattenmikroskop auf das Vorhandensein typischer Plaques untersucht. Kontrollen wie bei den Versuchen mit Influenza - Virus.

3. Angaben zu den Versuchen mit Vaccinia - Virus Stamm Herzberg:

Das Material wurde aus dicht mit spezifischen Plaques besäten Chorionallantoismembranen gewonnen. Verdünnung des Homogenisats mit Parker - Lösung. ID_{50} : $10^{-6,3}$. Aufbewahrung des Virus in Einzelmengen auf Trockeneis. Vor jedem Versuch Weiterverdünnung der Ausgangssuspension auf 10^{-4} mit Parker - Lösung. Inaktivierung des Virus im Wasserbad wie bei den Versuchen mit Influenza-Virus beschrieben. Infektiositätsnachweis: Beimpfung der gesenkten Chorionallantoismembran mit je 0,1 ml, - pro Ampulle fünf Eier. Nach zwei - bis dreitägiger Bebrütung bei 38 Grad C makroskopische Untersuchung der Allantoismembranen auf das Vorhandensein typischer Plaques.
Kontrollen wie bei den Versuchen mit Influenza - Virus.

4. Angaben zu den Versuchen mit Adeno - Virus 5:

Das Virus war auf HeLa - Zellkulturen gezüchtet und zusammen mit der als Nährmedium dienenden Hanks - Lösung geerntet worden. Nach Abzentrifugierung von in der Suspension verbliebenen Zellen und Zellbestandteilen diente die so gewonnene Virussuspension unverdünnt als Untersuchungsmaterial. Die Testung des Virus bei 50, 55 und 60 Grad C erfolgte an einem einzigen Tag, damit für den Infektiositätsnachweis Zellkulturen gleicher Herkunft benutzt werden konnten. Der Vorteil der Verringerung der Versuchsansätze mußte mit dem Nachteil erkauft werden, daß pro Zeitstufe nur eine Ampulle dem Wasserbad entnommen wurde, da sonst die Zahl der an einem Tag zu bearbeitenden Gewebekulturen zu groß gewesen wäre. Für jeden Versuchsansatz wurde das Virus neu gezüchtet. Auf diese Weise kamen verschiedentitrige Suspensionen zur Prüfung. Zwei Versuche wurden mit einer Virussuspension durchgeführt, die eine ID_{50} von $10^{-2,5}$, ein dritter Versuch mit einer Suspension, die eine ID_{50} von 10-6,2 aufwies. Die Inaktivierung im Wasserbad erfolgte wie bei den anderen Virusarten. Aus dem Inhalt jeder Ampulle wurden vier HeLa - Zellkulturen mit je 0,2 ml beimpft. Da die Untersuchung der Zellkulturen auf das Vorhandensein cytopathologischer Effekte nicht nur mit der in vivo - Mikroskopie, sondern auch am fixierten und gefärbten Präparat geschehen sollte, wurden die HeLa - Zellen auf optisch indifferenten Plastikfolien im Reagensglas gezüchtet. Nach zwei - bis dreitägiger Bebrütung der inokulierten Kulturen bei 37 Grad C wurden die Folien entnommen und aufgearbeitet. Die Technik dieser Methode und die Kriterien der lichtmikroskopisch sichtbaren cytopathologischen Erscheinungen wurden von Köhler und Apodaca (14) 1966 beschrieben.
Dadurch, daß auch die gefärbten Präparate auf den CPE hin durchgesehen werden konnten, wurden Fehlbeurteilungen, die bei der ausschließlich in vivo - mikroskopischen Betrachtung der Kulturen möglich sind, weitgehend ausgeschlossen.

Ein gesonderter Versuch wurde mit in Kaninchenserum suspendiertem Adeno - Virus 5 unternommen. Dieses Experiment sollte Auf-

schluß darüber geben, ob das Serum in vitro einen erkennbaren protektiven Effekt auf das Virus ausüben kann, wenn es der Wärme ausgesetzt wird.

Etwa 140 ml einer frisch bereiteten Suspension von Adeno - Virus 5 in Hanks - Lösung wurde drei Stunden lang bei 50000 U/min in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Ein Konzentrat von 10 ml wurde dann in 50 ml vorher auf Antikörperfreiheit gegen Adeno - Viren geprüften Kaninchenserums gegeben. Mit dieser Suspension wurde die Hitzeinaktivierung bei 50, 55 und 60 Grad C an einem einzigen Tag durchgeführt, gleichzeitig erfolgte die Titration des Untersuchungsmaterials. Die ID_{50} betrug $10^{-7,5}$.

Das zuletzt beschriebene Experiment schuf eine gewisse Parallele zu dem von W.P. Havens (11) beschriebenen Versuch mit Hepatitis - Serum.

Bei allen Versuchen liefen wiederum positive und negative Kontrollen mit.

IV. ERGEBNISSE

1. Versuchsprotokoll:

Zur Veranschaulichung der Streubreite der gefundenen Ergebnisse folgt die Wiedergabe des Versuchsprotokolls, das bei den Experimenten mit Influenza - Virus A_2 Berlin 12/60 angefertigt wurde.

Titration des Virus	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
am 28.10.67	+	+	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-

Durchführung der Inaktivierungsversuche mit einer tausendfachen Verdünnung der titrierten Ausgangssuspension.

31.10.67: Inaktivierung bei 60 Grad C.

Einwirkungszeit der Temperatur	30 sek.			45 sek.			60 sek.			3 min.			5 min		
Ampullenzahl	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Infektiositäts-	+	+	+	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-
nachweis auf 3	+	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-	/	-	-	-
Eiern pro Amp.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-

Die mit / bezeichneten Eier waren abgestorben und mußten verworfen werden.

7.11.67: Experiment bei 60 Grad C.

Einwirkungszeit der Temperatur	25 sek.			45 sek.			60 sek.			3 min.			5 min.		
Ampullenzahl	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Infektiositäts-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nachweis auf 3	-	+	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eiern pro Amp.	/	-	+	-	/	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-

15.1.68: Inaktivierung bei 60 Grad C.

Einwirkungszeit der Temperatur	10 sek.	30 sek.	45 sek.	60 sek.	3 min.
Ampullenzahl	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
Infektiositäts-nachweis auf 3 Eiern pro Amp.	+ + +	+ + +	- - -	- - /	- - -
	/ + +	/ + -	- - -	- - -	- - -
	+ / +	- + -	- - -	- - -	- / -

8.1.68: Inaktivierung bei 55 Grad C.

Einwirkungszeit der Temperatur	1 min.	5 min.	10 min.	15 min.	25 min.
Ampullenzahl	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
Infektiositäts-nachweis auf 3 Eiern pro Amp.	+ + +	- + +	- - -	- - -	- - -
	+ + +	+ - /	- - -	- - -	- - /
	+ + +	- + +	- - -	- - /	- - -

13.1.68: Inaktivierung bei 55 Grad C.

Einwirkungszeit der Temperatur	5 min.	6 min.	7 min.	8 min.	10 min.
Ampullenzahl	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
Infektiositäts-nachweis auf 3 Eiern pro Amp.	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
	- + -	- - -	- - -	- - -	- - -
	- - -	- - -	- - -	- - /	- - -

16.1.68: Inaktivierung bei 55 Grad C.

Einwirkungszeit der Temperatur	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.
Ampullenzahl	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
Infektiositäts-nachweis auf 3 Eiern pro Amp.	+ + -	- - -	- - -	- - -
	- + /	/ - -	- - -	- - -
	+ + +	+ - -	- - -	- - -

13.11.67: Inaktivierung bei 50 Grad C.

Einwirkungszeit der Temperatur	1 min.	2 min.	3 min.	5 min.	10 min.
Ampullenzahl	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
Infektiositäts-nachweis auf 3 Eiern pro Amp.	+ + Ø	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	+ + Ø	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
	+ + Ø	+ + /	+ + +	+ + +	+ + +

Die mit Ø bezeichneten Eier konnten nicht beimpft werden, da die Ampulle im Wasserbad zerbrochen war.

18.11.67: Inaktivierung bei 50 Grad C.

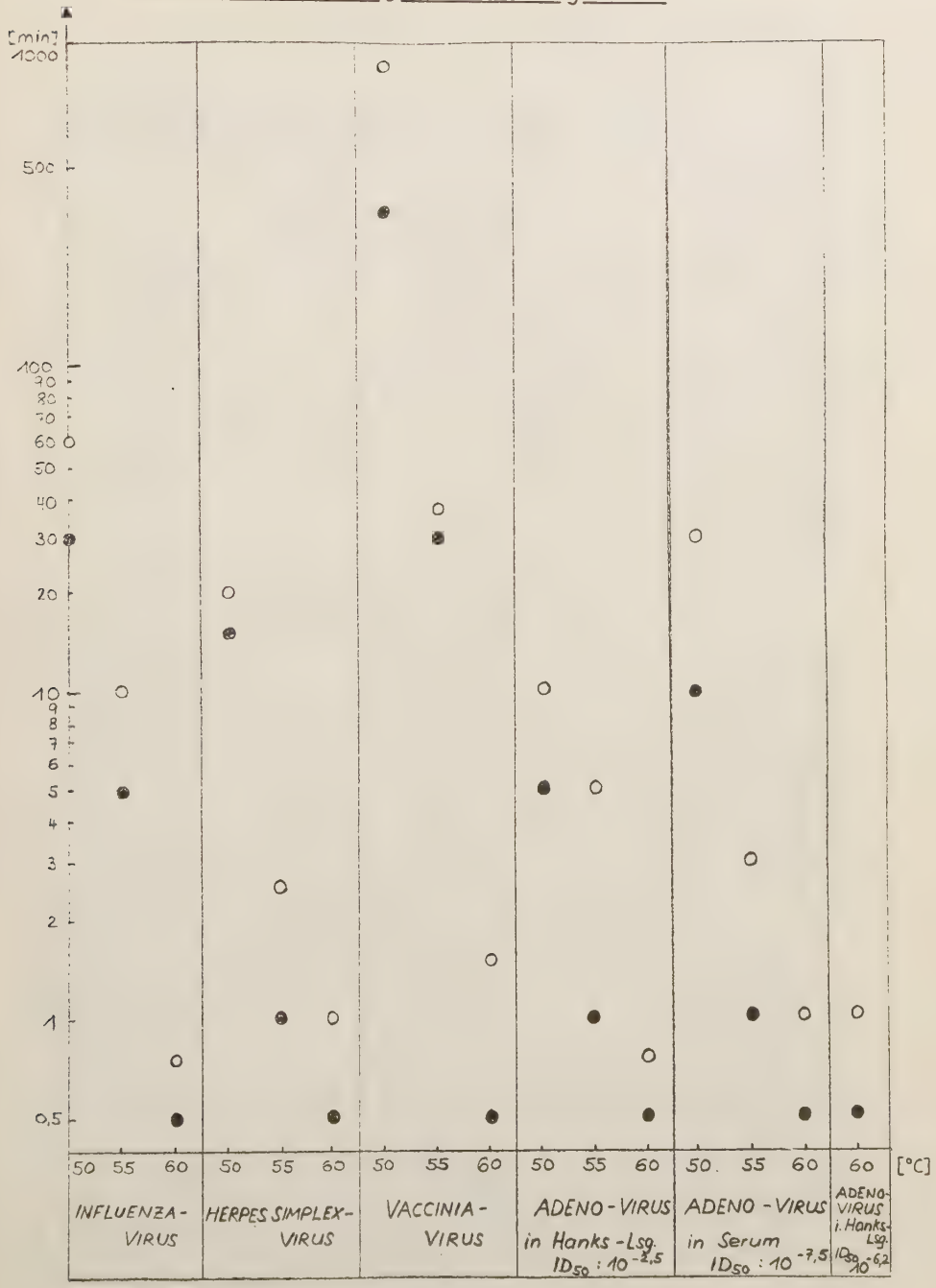
Einwirkungszeit der Temperatur	10 min.	15 min.	20 min.	30 min.	60 min.
Ampullenzahl	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
Infektiositäts-nachweis auf 3 Eiern pro Amp.	/ + +	± + +	+ + +	- - -	- - -
	+ + +	+ + +	- + +	- / -	- - -
	+ + +	/ + +	+ + +	+ - -	- - /

20.11.67: Inaktivierung bei 50 Grad C.

Einwirkungszeit der Temperatur	20 min.	25 min.	27 min.	30 min.	35 min.
Ampullenzahl	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
Infektiositäts-nachweis auf 3 Eiern pro Amp.	+ + +	- Ø -	- - -	- - -	- - -
	+ + +	+ Ø -	- - +	+ + -	- - -
	+ / +	- Ø -	- - -	+ / -	/ + -

Titration des Virus	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
am 16.1.68	+	+	+	+	+	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-

2. Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse:



● infektiöses Virus noch nachgewiesen

○ infektiöses Virus nicht mehr nachgewiesen

3. Tabellarische Übersicht der Ergebnisse:

Virusart	Zahl d. Versuche	infektiöses Virus noch nachgewiesen nach...	kein infektiöses Virus mehr nachgewiesen nach...
		bei 60 Grad Celsius	
Influenza	3	30 sek.	45 sek.
Herpes simpl.	1	30 sek.	60 sek.
Vaccinia	2	30 sek.	90 sek.
Adeno 5 Titer: $10^{-2,5}$ i. Hanks - L.	2	30 sek.	45 sek.
Adeno 5 Titer: $10^{-6,2}$ i. Hanks - L.	1	30 sek.	60 sek.
Adeno 5 Titer: $10^{-7,5}$ i. Serum	1	30 sek.	60 sek.
		bei 55 Grad Celsius	
Influenza	3	5 min.	10 min.
Herpes simpl.	2	1 min.	2 1/2 min.
Vaccinia	2	30 min.	35 min.
Adeno 5 Titer: $10^{-2,5}$ i. Hanks - L.	2	1 min.	5 min.
Adeno 5 Titer: $10^{-7,5}$ i. Serum	1	1 min.	3 min.
		bei 50 Grad Celsius	
Influenza	3	30 min.	60 min.
Herpes simpl	2	15 min.	20 min.
Vaccinia	3	5 h.	14 h.
Adeno 5 Titer: $10^{-2,5}$ i.Hanks - L.	2	5 min.	10 min.
Adeno 5 Titer: $10^{-7,5}$ i. Serum	1	10 min.	30 min.

Das Influenza - und Herpes simplex - Virus waren in gepuffter NaCL-Lösung, das Vaccinia - Virus in Parker - Lösung suspendiert.

V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die graphische Darstellung der Ergebnisse im Koordinatensystem vermittelt einen Eindruck von der Gleichförmigkeit des Verhaltens der hier untersuchten Viren bei Temperaturen zwischen 50 und 60 Grad Celsius. Besonders bei 60 Grad C ergaben sich kaum Differenzen in der Thermostabilität der vier Virusarten. Lediglich das Vaccinia - Virus erwies sich als geringfügig resistenter. Bei den beiden niederen Temperaturen ist die größere Stabilität des Vaccinia - Virus auffälliger. Bei 50 Grad C bleibt das Vaccinia - Virus über viele Stunden infektiös, während die Inaktivierung der anderen Virusarten innerhalb einer Stunde abgelaufen ist. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß bei noch höheren Temperaturen als 60 Grad C eine Differenzierung der Thermostabilität der hier untersuchten Viren nicht mehr möglich ist.

Aus der Fragestellung, die den Experimenten zugrunde lag, geht hervor, daß keine Absolutwerte der Thermostabilität dieser Viren ermittelt werden sollten. Es handelte sich lediglich um den Versuch, einige Viren in ihrem Verhalten gegenüber Wärme unter annähernd konstanten Bedingungen zu vergleichen. Dieser Hinweis möge vor einer Fehlinterpretation der gefundenen Ergebnisse schützen. Es können dieselben Virusarten unter anderen Voraussetzungen ein völlig differentes Verhalten gegenüber Hitze zeigen. Will man herausfinden, welche Temperaturen ein Virus maximal überleben kann, muß man sich vor Augen halten, wie groß die Zahl der chemischen und physikalischen Faktoren ist, die auf die Thermostabilität des Virus Einfluß nehmen können. Es dürfte dem Experimentator kaum gelingen, das Milieu zu imitieren, in dem ein Virion optimale Bedingungen für den Widerstand gegen Wärme vorfindet.

Welche Faktoren sind für den Ausfall der Ergebnisse von Thermoinaktivierungsexperimenten mit Viren von besonderer Bedeutung? -

a) Sehr wichtig ist der Aggregatszustand des Untersuchungsmaterials. Wird das Virus nach voraufgegangener Trocknung der Hitze ausgesetzt, so kann seine Überlebensfähigkeit extrem verbes-

sert sein. Bock (16) berichtete 1956 über eine ungewöhnliche Thermoresistenz von Influenza -, Herpes -, Ektromelie -, EMC - (Encephalomyocarditis -) und Mäuseencephalitis - Viren. Das Virus war zunächst getrocknet und dann nach Resuspendierung erhitzt worden. Bei diesen Experimenten konnte außerdem erneut gezeigt werden, daß Beimengungen organischen Materials die Thermostabilität des Virus erhöhen.

b) Wird das Virus in flüssigem Milieu erhitzt, hat die Zusammensetzung des Mediums einen entscheidenden Einfluß auf das Resultat der Inaktivierung. Thomssen (17) zitierte 1966 in einer Abhandlung über in - vitro - Merkmale von Polio - Viren die Arbeiten mehrerer Autoren, die sich mit der Thermoinaktivierung des Polio - Virus beschäftigt und dabei Faktoren herausgefunden hatten, die eine thermische Inaktivierung des Polio - Virus bei 50 Grad C hemmen können: z.B. SH - haltige Aminosäuren wie Cystin, Pohjanpelto (18), Ikegami (19), Polysulfide, Pons (20), ein- und zweiwertige Kationen, Wallis und Melnick (21), organische und anorganische Säuren, Wallis und Melnick (22), anaerobes Milieu, Pohjanpelto (23). Wallis, Smith und Melnick berichteten 1964 (24) außerdem über eine Erhöhung der Thermoresistenz von Reo - Viren durch 2 molare $MgCl_2$ - Lösung, Rapp, Butel und Wallis (25) über eine stabilisierende Wirkung von Sulfationen auf das Masern - Virus.

c) Die Methodik des Infektiositätsnachweises ist für den Ausfall der Ergebnisse von großer Wichtigkeit. W. Henle (26) hatte 1960 darauf hingewiesen, daß dem Problem des Virusnachweises im Vergleich zu den die Inaktivierung der Viren unmittelbar betreffenden Fragen zuwenig Bedeutung beigemessen worden war. Zwei Phänomene stellte er heraus: 1. die Mehrpartikelaktivierung und 2. die Interferenzaktivität. Das eine Phänomen kommt zum Tragen, wenn der Infektiositätsnachweis in einer Virussuspension geführt wird, in der noch beträchtliche Mengen infektiöser Virionen enthalten sind, das andere, wenn es darum geht, - wie in unseren Experimenten -, kleinste Mengen aktiven Virus in einer fast völlig inaktivierten Virussuspension nachzuweisen.

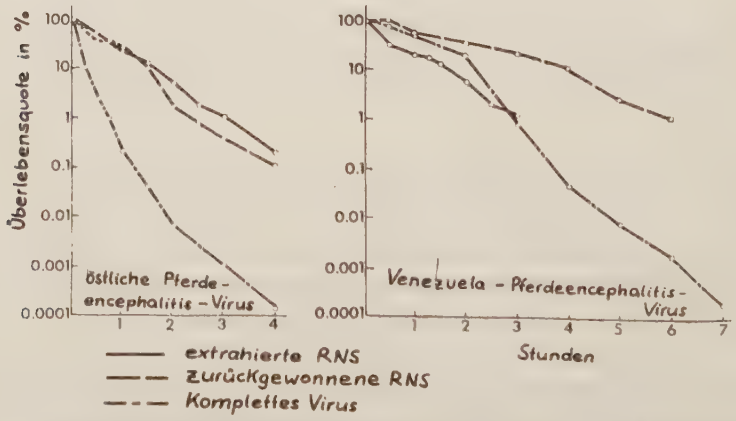
Die als "Mehrpartikelaktivierung" bezeichnete Erscheinung ist dadurch charakterisiert, daß eine Virussuspension, in der eine kleine Fraktion auf irgendeine Weise inaktivierter Viren enthalten ist, wesentlich höhere Infektiositätstiter erreicht als eine Suspension ohne diese Beimengung von zerstörtem Virus. Wird eine minimale Menge von infektiösem Virus durch große Mengen inaktivierter Viren unterdrückt, spricht W. Henle von Interferenzaktivität. Der Autor entdeckte, daß eine beträchtliche Dosis UV - oder hitzeinaktivierten Virus auf Hühnerembryonen keine Hämagglutininproduktion erzielte, während nach einer Verdünnung des Inokulums die vorher verschleierte Infektiosität klar zu Tage trat.
Beide von Henle beschriebenen Phänomene können die Ergebnisse von Thermoinaktivierungsversuchen an Viren unbemerkt beeinflussen.

Ein negativer Ausfall des Infektiositätsnachweises erscheint in einem anderen Licht, wenn man sich vorstellt, daß bei der Thermoinaktivierung eventuell lediglich die Proteinhülle des Virion zerstört wird, die ihm die Adsorption und Penetration ermöglicht. Es ist denkbar, daß das eigentliche infektiöse Agens, die Virusnukleinsäure, völlig intakt geblieben ist. Könnte diese unversehrte Nukleinsäure, sei es mit oder ohne den funktionsuntüchtigen Proteinanteil des Virus, in die Wirtszelle gelangen, so nähme dort wahrscheinlich der normale Infektionszyklus mit der identischen Reduplikation des Virusgenoms seinen Lauf.

Für den ersten Teil dieser Hypothese, das Überleben der Nukleinsäure in einem durch Hitzewirkung in seiner Vitalität gestörten Virus, haben mehrere Autoren Beweise geliefert.

Mika, Officer und Brown (4) sahen sich 1963 zu dem Postulat veranlaßt, daß die völlige Inaktivierung eines Virus eine irreversible Zerstörung der Nukleinsäure zur unumstößlichen Voraussetzung hat. Die Autoren hatten östliche-Pferdeencephalitis - Virus und Venezuela - Pferdeencephalitis - Virus (= VEE), zwei Arbo - Viren, bei 50 Grad Celsius inaktiviert. Sie ermittelten für beide Viren die Inaktivierungskurven. Diese Kurven verglichen sie mit

denen, die sie bei der Hitzeinaktivierung der extrahierten RNS, d.h. der aus dem unbehandelten Virus extrahierten RNS, sowie der rückzugewinnenden RNS, d.h. der aus dem hitzebehandelten Virus zu verschiedenen Zeitpunkten der Inaktivierung gewonnenen RNS, erhielten. Aus den Differenzen der Inaktivierungskurven der beiden Gesamtviren und ihrer rückzugewinnenden RNS ergab sich der Schluß, daß sich die Nukleinsäuren ziemlich deutlich in ihrer Hitzeresistenz unterscheiden und für die verschiedene Thermoresistenz der kompletten Viren verantwortlich sind. Die Untersuchung der extrahierten RNS beider Virusarten widerlegte diese Vermutung. Die aus dem unbehandelten Virus gewonnenen Nukleinsäuren zeigten völlig identische Inaktivierungskurven. Die Differenz der Inaktivierungskurven der aus dem hitzebehandelten Virus zu extrahierenden RNS scheint auf einer unterschiedlichen protektiven Kapazität der dazugehörigen Viruslipoproteine zu beruhen.
Die nachstehende Abbildung ist der Arbeit von Mika, Officer und Brown entnommen.



Vergleich der Inaktivierungsrate von östliche - und Venezuela-Pferdeencephalitis - Virus bei 50°C

Da die Inaktivierungskurven der beiden Virusarten in der Schlußphase parallel verlaufen, ist es möglich, daß zu diesem Zeitpunkt das Virusprotein die Inaktivierung nicht mehr beeinflußt, der Kurvenverlauf also allein vom Verhalten der Nukleinsäuren bestimmt wird.

Norman und Veomett (27) haben 1960 ebenfalls bewiesen, daß die Inaktivierung der Nukleinsäure nicht mit der des Gesamtvirus parallel geht. Die von ihnen durchgeführten Versuche mit dem Polio - Virus brachten ein interessantes Ergebnis. Das Verhalten der RNS zeigte deutliche Abweichungen von dem des intakten Virus. Besonders bei hohen Temperaturen ist die RNS viel stabiler als das ganze Virus. Ein 5 minütiges Erhitzen auf 60 Grad Celsius bewirkte bei der RNS einen Infektiositätsverlust von weniger als einer Zehnerpotenz, beim Gesamtvirus dagegen einen Verlust von etwa sieben Zehnerpotenzen.

Bachrach (28) teilte mit, daß Maul - und Klauenseuche - Virus nach 5 minütigem Kochen bei 100 Grad Celsius völlig inaktiviert zu sein schien, jedoch noch infektiöse RNS enthielt, die sich mit Phenol extrahieren ließ. Diese Nukleinsäure blieb nach 5 minütiger Erwärmung auf 85 Grad Celsius teilweise infektiös. Derselbe Autor berichtet an anderer Stelle, daß auf 61 und 85 Grad Celsius erhitztes Maul - und Klauenseuche - Virus schließlich infektiöse RNS entläßt, vorausgesetzt, die im umgebenden Milieu enthaltene RNase wird vor Beginn des Experimentes entfernt oder durch SDS (Sodiumdodecylsulfat) inaktiviert.

Brown, Cartwright und Stewart (6) untersuchten 1963 das Verhalten von Maul - und Klauenseuche - Virus und seiner infektiösen Nukleinsäure bei Temperaturen von 25 und 37 Grad Celsius. In diesem Falle erwies sich die Nukleinsäure gegenüber dem Gesamtvirus als empfindlicher, so als fehlten ihr die protektiven Eigenschaften der sie normalerweise umgebenden Lipoproteine. Mit der Feststellung, daß die Virusinaktivierung bei relativ niederen Temperaturen in erster Linie einer Veränderung der Nukleinsäure zuzuschreiben ist, standen die Autoren im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeiten. Die Beständigkeit der antigenen und physikalischen Eigenschaften des Virus bei niederen Temperaturen spricht für die Unversehrtheit des Virusproteins, Dimmock (29) 1967, Woese (12) 1959, Doggett et al. 1963 (zitiert bei Dimmock (29)), Brown et al. (6) 1963.

Bei 50 Grad C fand Thomssen (17) eine Veränderung der Virusdichte, Auftreten von RNase - Empfindlichkeit der Virusnukleinsäure und Verlust der D - Antigenspezifität als Ausdruck einer mit der Virusinaktivierung parallel ablaufenden Destruktion der Partikelstruktur. Er sprach von einer Zweikomponentenkinetik der thermischen Inaktivierung von Viren und stellte der schnellen Komponente des Partikelzerfalls die langsame Komponente der zerfallsunabhängigen Inaktivierung gegenüber. Die langsame Komponente beherrscht die Inaktivierung bei niederen Temperaturen und dürfte in erster Linie einer Veränderung der Virusnukleinsäure entsprechen.

Dimmock (29) hat 1967 die Beobachtungen und Interpretationen vieler Autoren zusammengefaßt, die sich um die Klärung des Wesens der thermischen Virusinaktivierung bemüht hatten: ..." Wir folgern, daß die Inaktivierung bei hohen Temperaturen in erster Linie durch eine Verletzung des Virusproteins und bei niederen Temperaturen durch eine Verletzung der RNS bedingt ist...." (eigene Übersetzung).

Wenn also bei hohen Temperaturen die Nukleinsäure des Virus beträchtlich stabiler zu sein scheint als der Proteinanteil, so ist es möglich, daß nach dem Inaktivierungsprozeß in der denaturierten Lipoproteinhülle des Virus intakte Nukleinsäure enthalten ist. Die Adsorption und Penetration des Virus in die Wirtszelle wäre zwar gestört, das eigentliche infektiöse Agens ist jedoch funktionstüchtig geblieben. Ein derartig verändertes Virus dürfte nur unter bestimmten Voraussetzungen als völlig inaktiv bezeichnet werden: 1. Wenn nur die Mitwirkung des unversehrten Proteins eine Infektion von Wirtszellen gestattete oder 2. wenn die Nukleinsäure zwar ohne die Unterstützung des Virusproteins eine Infektion setzen könnte, jedoch den inaktiven Proteinmantel nicht verlassen kann. Beide Voraussetzungen werden nicht erfüllt.

Bachrachs (21) Mitteilung, daß Maul - und Klauenseuche - Virus bei Erhitzung auf 61 bis 85 Grad Celsius zu infektiöser Nuklein-

säure "degradiert" wird, läßt vermuten, daß die Nukleinsäure nicht unlösbar im Virusprotein verankert ist, - ein Austritt aus dem Viruskern erscheint denkbar. Bachrach stellte fest, daß die nach der Erwärmung verbliebene Infektiosität gegen Ribonuklease empfindlich ist, - entweder hat die Nukleinsäure den Proteinmantel verlassen oder die Protektion durch das Protein ist in einer Weise gestört, daß ein Kontakt zwischen RNS und RNase stattfindet.

Koch (30) hatte 1960 ebenfalls beobachtet, daß auf 54 Grad Celsius erhitztes Polio - Virus in der Schlußphase der Inaktivierung RNase - Empfindlichkeit zeigt. Er wies gleichzeitig einen signifikanten Effekt von hypertoner Salzlösung auf die Infektion von Amnion - Zellkulturen mit nicht adsorbierendem Virus nach, d.h. mit Virus, dessen Protein zerstört, dessen Nukleinsäure aber unverändert geblieben ist. Dieser Effekt kam nur im Endverlauf der Inaktivierungskurve zum Ausdruck, da er so geringe Effizienz besitzt, daß er durch das Verhalten größerer Mengen aktiver Virionen völlig überdeckt wird.
Zur Klärung der Frage, ob die "nackte" Nukleinsäure in eine Wirtszelle eindringen und im Zellinnern ohne das sie sonst begleitende Protein den üblichen Lebenszyklus des Virus mit der Induktion der identischen Republikation fortsetzen kann, hat Maksimovich (31) 1969 einen Beitrag geliefert. Der Autor beschrieb für die Adeno - Viren Typ 4 und 12 einen Ausbreitungsmodus in der Gewebekultur, der den bis dahin herrschenden Vorstellungen über die Zellinfektion durch Viren widersprach.
Die zu verschiedenen Zeiten der Inkubation geerntete Kulturflüssigkeit wurde mit Nukleasen versetzt. 10 bis 24 Stunden nach der Inokulation der Kulturen mit dem Virus befand sich im Kulturmedium nur solche Infektiosität, die durch Nukleasenwirkung zerstört wurde. Es schien sich dabei um die nackte Virusnukleinsäure zu handeln. Zu einem späteren Zeitpunkt der Inkubation erschien auch DNase - resistente Infektiosität in der Kulturflüssigkeit. Der Autor ordnete sie den kompletten Viren einer neuen Generation zu.

Das Erscheinen der frühinfektiösen, DNase - empfindlichen Kräfte wurde als Austritt reiner Nukleinsäure aus den infizierten Zellen gewertet. Diese isolierte Nukleinsäure vermochte wiederum in noch nicht infizierte Zellen einzudringen und dort eine Virusvermehrung zu veranlassen. Zusammenfassend sprach Maksimovich von zwei Wegen der Reproduktion von Adeno - Viren: 1. Infektion von Zellen mit reifen Virionen, - "postreproduktiver Weg". 2. Zellinokulation mit Virusnukleinsäure ohne Protein, - "interreproduktiver Weg".
Der interreproduktive Infektionsmodus schien nicht nur wenige Stunden nach der Inokulation der Zellkulturen mit dem Virus Bedeutung zu haben. Maksimovich sah, daß auch nach 72 stündiger Inkubation immer noch 50 % der nachweisbaren Infektiosität DNase - empfindlich war. Zu jedem Zeitpunkt der Inkubation scheinen einige Zellen gerade das Stadium zu durchlaufen, in dem sie infektiöse Virusnukleinsäure ausstoßen, während andere Zellen bereits reife Viren entlassen. Für dieses Phänomen wurde der Begriff der Asynchronie der Virus - Reproduktion geprägt.

Salgonik und Truchatschow (zitiert bei Maksimovich (31)) hatten schon 1963 erkannt, daß bei der Aufzucht von Adeno - Viren in Kulturgewebe eine deutliche Verzögerung der Virusvermehrung eintrat, wenn dem Kulturmedium Nukleasen zugesetzt wurden. Sie schrieben diese Hemmwirkung der Nuklease einer Zerstörung DNase - empfindlicher Kräfte zu, die im Verlauf der Virusvermehrung im inokulierten Zellverband erscheinen. Die Autoren hatten offen gelassen, ob der Angriffspunkt des Fermentes intra - oder extra - zellulär lag. Maksimovich entschied sich mit seiner Arbeitshypothese für den extrazellulären Wirkungsort.

Ein analoger Vermehrungsmodus könnte auch bei anderen Virusarten eine Rolle spielen. Der Proteinanteil des Virus als infektionseinleitendes und nukleinsäureschützendes Substrat scheint für den Ablauf eines Infektionszyklus nicht immer obligat zu sein. Es lassen sich noch andere, mehr oder weniger hypothetische Wege anführen, wie die isolierte Nukleinsäure in das Innere einer

Wirtszelle gelangen kann. Denkbar ist die Aufnahme des infektiösen Agens durch Pinocytose oder Phagocytose von Freßzellen, das passive Eindringen durch mechanische Fremdeinwirkung oder die Überwindung der Zellmembran an Defektstellen.

Die Forderung Mikas und seiner Mitarbeiter (4), daß die völlige Inaktivierung eines Virus der irreversiblen Zerstörung seiner infektiösen Nukleinsäure bedarf, hat somit seine Berechtigung.

Bei unseren Experimenten war aufgefallen, daß bei 60 Grad Celsius alle vier untersuchten Virusarten nach 1/2 bis 1 1/2 minütiger Erhitzung so stark geschädigt waren, daß sich im Infektiositätsnachweis kein aktives Virus mehr zeigte. Die Nachweismethoden erlaubten jedoch keine Aussage darüber, ob der Inaktivierungsvorgang sowohl den Proteinanteil als auch die Nukleinsäure der Viren erfaßt hatte. Zu diesem Zweck hätte der Versuch unternommen werden müssen, nach dem Erwärmungsprozeß Nukleinsäure aus dem Virus zu extrahieren und auf eventuell noch vorhandene Infektiosität zu testen.
Die Gleichförmigkeit der Reaktion der Viren gegenüber der Versuchstemperatur von 60 Grad Celsius darf also lediglich als Ausdruck der Zerstörung einer bei allen vier Arten gleich empfindlichen Komponente gewertet werden, die bei der gewählten Nachweismethode keine Virus - Reproduktion zuließ. Dabei könnte es sich um die Virus - Lipoproteine gehandelt haben.

Das Adeno - Virus 5 hat sich im Vergleich zum Influenza -, Herpes simplex - und Vaccinia - Virus in keinem Temperaturbereich als thermostabiler gezeigt. Es zeigte keine dem Hepatitis - Virus vergleichbare Thermostabilität. In Serum suspendiert überlebte das komplette Virus nur etwa 1 Minute lang, wenn es auf 60 Grad Celsius erhitzt wurde.
Offen bleibt die Möglichkeit, daß sich die Nukleinsäure des Adeno - Virus durch eine über das übliche Maß hinausgehende Thermostabilität auszeichnet. Dieser eventuellen Beständigkeit der Virusnukleinsäure ist deshalb besondere Bedeutung bei-

zumessen, weil Maksimovich gerade für zwei Typen des Adeno - Virus eine gewichtige Rolle der isolierten Nukleinsäure im Prozeß der Virusvermehrung erkannt hat.

Akzeptiert man in einem Gedankenexperiment die Identität eines Adeno - Virus mit dem Erreger der Hepatitis infectiosa, so ergäbe sich unter Berücksichtigung der Thesen Maksimovichs die Aussicht, daß auch bei der Epidemiologie und Pathogenese der Hepatitis die nackte Virusnukleinsäure eine zentrale Funktion innehat. Damit wäre die Erklärung mancher Besonderheit des Hepatitis - Virus nahegerückt, allen voran die der "ungewöhnlichen Thermoresistenz" des Erregers.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) Dougherty, R.M. : 1961, Virology 14: 371 : Heat Inactivation of Rous Sarcoma Virus

(2) Rapp, F., Butel, J.S. und C. Wallis : 1965, J. Bacteriol. 90:132 - 35 (1) : Protection of Measles Virus by Sulfate Ions Agaist Thermal Inactivation

(3) Bachrach, H.L. et al. : 1957, J. Gen. Microbiol. 18:499 - 504: Inactivation of Foot - and - Mouth Disease Virus by pH and Temperature Changes and by Formaldehyde

(4) Mika, L.A. et a. : 1963, J. Inf. Dis. 113:195 - 203 : Inactivation of Two Arboviruses and Their Associated Infectious Nucleic Acids

(5) Kaplan, C. : 1958, J. Gen. Microbiol. 18:58 - 63 : The Heat Inactivation of Vaccinia Virus

(6) Brown, F., Cartwright, B. und D.L. Stewart : 1963, J. Gen. Microbiol. 31:179 - 186 : The Effect of Various Inactivating Agents on the Viral and Ribonucleic Infectivities of Foot - and - Mouth Disease Virus and on its Attachment to Susceptible Cells

(7) Krugmann, R.D. und C.R. Goodheart : 1964, Virology 23:290 : Human Cytomegalovirus. Thermal Inactivation

(8) Boak, Carpenter und Warren: 1940, J. Exper. Med. 71:169 : The Thermal Inactivation Time at 41,5 C of Three Strains of Herpes Simplex Virus

(9) Giacometti, G.: 1965, Boll. Ist. Sier. 44:8 - 14 (1 - 2) : Inattivazione Termica di un Virus Isolata da Pemfigo

(10) Simpson, R.W. und R.E. Hauser :
1968, Virology 34:361 - 364 :
Effect of Heat on Virions of Wild - Type Sinbis Virus and a Thermostable Mutant

(11) Havens, W.P. Junior : 1945, Proc. Soc. Exptl. Med. 58:203 - 204

(12) Woese, C. : 1959, Ann. N.Y. Acad. Sci. 83:741 :
Thermal Inactivation of Animal Viruses

(13) Henneberg, G. und H. Köhler : 1961, Gustav Fischer Verlag/ Stuttgart Praktikum der Virusdiagnostik

(14) Köhler, H. und J. Apodaca : 1966, Zbl. Bakt. Orig. 199 :
Über die Erkennung von Adenovirus - Infektionen in Schweinenieren - Primärkulturen mit Hilfe histologischer Verfahren

(15) Jawetz, E., Melnick, J.L. und E.A. Adelberg :
1966, Springer - Verlag/Berlin, Heidelberg, N.Y. : S. 385 - 386 : Medizinische Mikrobiologie

(16) Bock, M. : 1956, Arzneimittelforschung 6:527 - 531 :
Zur Thermoresistenz von Viren

(17) Thomssen, R. : 1966, Ergebn. Mikrobiol. Immun. Forsch. u. exptl. Ther. 39:206 :
In - vitro - Merkmale von Polioviren

(18) Pohjanpelto, P. : 1958, Virology 6:472 :
Stabilization of Poliovirus by Cystine

(19) Ikegami, N. et al. : 1963, Jap. J. Med. Sci. Biol. 16:325 :
The Stabilizing Effect of L - Cystine on the Thermal Inactivation of Poliovirus by Heating with L - Cystine

(20) Pons, M.: 1964, Virology 22:253 - 261 :
Stabilization of Poliovirus by Sodium Tetrasulfide

(21) Wallis, C. und J.L. Melnick : 1961, Tex, Rep. Biol. Med. 19 : 683 : Stabilization of Poliovirus by Cations

(22) Wallis, C. und J.L. Melnick : 1962, Proc. Soc. Exptl. Biol. (N. Y.) 111:305 : Effect of Organic and Anorganic Acid on Poliovirus at 50 ° C

(23) Pohjanpelto, P.: 1962, Virology 16:92 : Oxidation in Thermoinactivation

(24) Wallis, C., Smith, K.O. und J.L. Melnick : 1964, Virology 22:606-619 : Reovirus Activation by Heating and Inactivation by Cooling in $MgCl_2$ Solutions

(25) Wallis, C. und J.L. Melnick : 1962, J. Bact. 84:389 : Thermal Inactivation of Poliovirus under Anaerobe Conditions

(26) Henle, W.: 1960, Ann. N.Y. Acad. Sci. 83:513-760 : Part III: Problems to be Considered in the Inactivation of Viruses

(27) Norman, A. und R.C. Veomett : 1960, Virology 12:136-139 : Heat Inactivation of Poliovirus Nucleic Acid

(28) Bachrach, H.L. : 1961, Proc. Soc. Exptl. Med. 107:610-613 : Thermal Degradation of Foot - and Mouth Disease Virus into Infectious Ribonucleic Acid

(29) Dimmock, N.J. : 1967, Virology 31:338-353 : Difference between the Thermal Inactivation of Picornaviruses at "High" and "Low" Temperatures

(30) Koch, G.: 1960, Virology 12:601 : Influence of Assay Conditions on the Infectivity of Heated Poliovirus.

(31) Maksimovich : 1969, Fragen der Virologie 2:208-216

LEBENSLAUF

Am 9.6.1944 wurde ich in Berlin - Zehlendorf als Sohn des Arztes Dr. med. Erich Otte und seiner Ehefrau Hildegard Otte geb. Hackel geboren.

Von 1956 bis 1963 besuchte ich das Diesterweg - Gymnasium in Berlin - Wedding. Nach Erlangung der Hochschulreife im Februar 1963 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin. Im April 1964 legte ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Oktober 1965 die Ärztliche Vorprüfung ab. Nach zwei Studiensemestern an der Universität Innsbruck kehrte ich 1966 nach Berlin zurück und beendete 1969 das Medizinstudium mit der Ärztlichen Prüfung. Während der einjährigen Medizinalassistentenzeit arbeitete ich vier Monate auf der Chirurgie - Abteilung und acht Monate auf der II. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Moabit in Berlin - Tiergarten.

Am 5. Mai 1970 erhielt ich in Berlin die Approbation. Ich bin z.Zt. als Assistenzarzt auf der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Am Urban in Berlin - Kreuzberg tätig und strebe die Ausbildung zum Facharzt für Innere Medizin an.

Seit dem 4. Juli 1969 bin ich mit Ingeburg Otte geb. Drews verheiratet.